

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2003 - 510053

(P2003 - 510053A)

(43)公表日 平成15年3月18日(2003.3.18)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-コード (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 0 7 K 16/40	2 G 0 4 5
C 0 7 K 16/40		C 1 2 N 1/15	4 B 0 2 4
C 1 2 N 1/15		1/19	4 B 0 5 0
1/19		1/21	4 B 0 6 3
1/21		9/88	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 53数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 525372(P2001 - 525372)

(86)(22)出願日 平成12年9月11日(2000.9.11)

(85)翻訳文提出日 平成14年3月22日(2002.3.22)

(86)国際出願番号 PCT/EP00/08837

(87)国際公開番号 W001/021814

(87)国際公開日 平成13年3月29日(2001.3.29)

(31)優先権主張番号 99118805.3

(32)優先日 平成11年9月23日(1999.9.23)

(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(31)優先権主張番号 00114649.7

(32)優先日 平成12年7月7日(2000.7.7)

(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(71)出願人 メルク パテント ゲゼルシャフト ミツト ベシュレンクテル ハフトング
 MERCK PATENT GESELLSCHAFT MIT BESCHR
 AENKTER HAFTUNG
 ドイツ連邦共和国 デー - 64293 ダルムシュ
 ュタット フランクフルター シュトラ
 セ 250

(72)発明者 デュエッケル、 クラウス
 ドイツ連邦共和国 64291 ダルムシュタ
 ット エッテステルシュトラセ 5

(74)代理人 弁理士 金田 暢之 (外 2名)

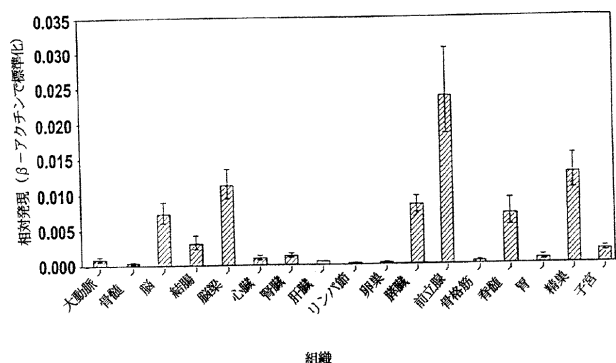
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヘパラーゼ蛋白質ファミリーの1種、ヘパラーゼ - 2

(57)【要約】

ヘパラーゼ - 2 ポリペプチドおよびポリヌクレオチドならびに組換え技術によってこのようなポリペプチドを産生する方法を開示する。診断アッセイにおいてヘパラーゼ - 2 ポリペプチドおよびポリヌクレオチドを利用する方法もまた開示する。

Hep-2のin vivo発現



【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) 配列番号1の配列を含むポリヌクレオチドによってコードされた単離ポリペプチド、
(b) 配列番号2のポリペプチド配列と少なくとも95%同一性を有するポリペプチド配列を含む単離ポリペプチド、
(c) 配列番号2のポリペプチド配列と少なくとも95%同一性を有する単離ポリペプチド配列、
(d) 配列番号2のポリペプチド配列、および
(e) (a)から(d)のこのようなポリペプチドの断片および変種から成る群の1つから選択された単離ポリペプチド。

【請求項2】 配列番号2のポリペプチド配列を含む請求項1に記載の単離ポリペプチド。

【請求項3】 配列番号2のポリペプチド配列である請求項1に記載の単離ポリペプチド。

【請求項4】 (a) 配列番号1のポリヌクレオチド配列と少なくとも95%同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチド、
(b) 配列番号1のポリヌクレオチドと少なくとも95%同一性を有する単離ポリヌクレオチド、
(c) 配列番号2のポリペプチド配列と少なくとも95%同一性を有するポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチド、
(d) 配列番号2のポリペプチド配列と少なくとも95%同一性を有するポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を有する単離ポリヌクレオチド、
(e) 厳密なハイブリダイゼーション条件下で配列番号1の配列または少なくとも15ヌクレオチドを有するその断片を有する標識プローブでライブラリをスクリーニングすることによって得られた少なくとも100ヌクレオチドのヌクレオチド配列を有する単離ポリヌクレオチド、
(f) (a)から(e)のポリヌクレオチドのRNA等価物であるポリヌクレオチド、
または、前記単離ポリヌクレオチドと相補的なポリヌクレオチド配列、

および前記ポリヌクレオチドの変種もしくは断片であるか、または前記ポリヌクレオチドとその全長にわたって相補的であるポリヌクレオチドから成る群の1つから選択された単離ポリヌクレオチド。

【請求項5】 (a) 配列番号1のポリヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチド、

(b) 配列番号1の単離ポリヌクレオチド、

(c) 配列番号2のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチド、および

(d) 配列番号2のポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチドから成る群から選択された請求項4に記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項6】 前記発現ベクターが適合宿主細胞中に存在するとき、請求項1のポリペプチドを産生することができるポリヌクレオチドを含む発現系。

【請求項7】 請求項6に記載の発現ベクターまたは請求項1に記載のポリペプチドを発現するその膜を含む組換え宿主細胞。

【請求項8】 前記ポリペプチドを産生するのに十分な条件下で、請求項7に記載の宿主細胞を培養し、前記培養培地から前記ポリペプチドを回収する段階を含む請求項1に記載のポリペプチド産生方法。

【請求項9】 免疫グロブリンFc領域と請求項1に記載のいずれか1つのポリペプチドとから成る融合蛋白質。

【請求項10】 請求項1から3のいずれか一項に記載のポリペプチドに免疫特異的な抗体。

【請求項11】 請求項1に記載のポリペプチドの機能または濃度を刺激または阻害する化合物を同定するためのスクリーニング方法であって、

(a) 候補化合物と前記ポリペプチド(または前記ポリペプチドを発現する細胞もしくは膜)またはその融合蛋白質との結合を、前記候補化合物と直接的または間接的に関連した標識によって、定量的または定性的に決定または検出すること、

(b) 標識競合剤の存在下で、候補化合物と前記ポリペプチド(または前記ポリペプチドを発現する細胞もしくは膜)またはその融合蛋白質との結合の競合を決

定すること、

(c) 前記候補化合物がポリペプチドの活性化または阻害によって発生する信号を引き起こすかどうかを、前記ポリペプチドを発現する細胞または細胞膜に適した検出系を使用して試験すること、

(d) 候補化合物と請求項1に記載のポリペプチドを含む溶液とを混合して、混合物を形成し、前記混合物中の前記ポリペプチドの活性を決定し、前記混合物の活性を候補化合物を含まない対照混合物と比較すること、または

(e) たとえば、ELISAアッセイを使用して、前記ポリペプチドをコードするmRNAまたは前記ポリペプチドの細胞中での産生に対する候補化合物の影響を検出すること、および

(f) 生物工学的または化学的標準方法に従って前記化合物を産生することから成る群から選択された方法を含む方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(発明の分野)**

本発明は、以後時々「ヘパラーゼ - 2」と称する新規に同定されたポリペプチドおよびこのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、診断と、治療に潜在的に有用なアゴニスト、アンタゴニストとなることが可能な化合物の同定とにおけるその使用、ならびにこのようなポリペプチドおよびポリヌクレオチドの産生に関する。

【0002】**(発明の背景)**

創薬プロセスは、近年「遺伝子特記解析 (functional genomics)」、すなわちゲノムまたは遺伝子をベースとした高スループットの生物学を含むように根本的な革新が行われつつある。治療目標としての遺伝子および遺伝子産物を同定する手段としてのこの手法は、「ポジショナルクローニング」をベースとした以前の手法に急速に取って代わりつつある。生物学的機能または遺伝的疾患である表現型を同定し、次いでそれをたどって遺伝子地図の位置に基づいて原因となる遺伝子を突き止めることになる。

【0003】

遺伝子特記解析は、高スループットのDNA配列決定技術および現在利用可能な多くの分子生物学データベースから関心の持たれる遺伝子配列を同定する様々な生物情報科学 (バイオインフォマティクス) 手段に大きく依存している。創薬の目標としてさらなる遺伝子およびそれに関係するポリペプチド / 蛋白質を同定し、特徴付けることが引き続き必要とされている。

【0004】**(発明の概要)**

本発明は、ヘパラーゼ - 2、特にヘパラーゼ - 2 ポリペプチドおよびヘパラーゼ - 2 ポリヌクレオチド、組換え物質およびその産生方法に関する。このようなポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、それだけには限らないが、自己免疫疾患、血液凝固障害、癌、糖尿病、虚血、敗血症および発作 (卒中)、心臓

血管疾患、血栓症を含めた各種の疾患（以後「本発明の疾患」と称する）の治療方法に関連して興味を持たれる。他の態様では、本発明は、本発明によって提供される物質を使用してアゴニストおよびアンタゴニスト（たとえば、阻害剤）を同定する方法、およびヘパラーゼ - 2 の不均衡に関連する状態を同定した化合物によって治療する方法に関する。さらに他の態様では、本発明は不適切なヘパラーゼ - 2 活性または濃度に関連する疾患を検出するための診断アッセイに関連する。

【0005】

（発明の詳細な説明）

第1の態様では、本発明はヘパラーゼ - 2 ポリペプチドに関する。このようなポリペプチドには、

（a）配列番号1の配列を含むポリヌクレオチドによってコードされた単離ポリペプチド、

（b）配列番号2のポリペプチド配列と少なくとも95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するポリペプチド配列を含む単離ポリペプチド、

（c）配列番号2のポリペプチド配列を含む単離ポリペプチド、

（d）配列番号2のポリペプチド配列と少なくとも95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する単離ポリペプチド、

（e）配列番号2のポリペプチド配列、

（f）配列番号2のポリペプチド配列と比較して0.95、0.96、0.97、0.98または0.99の同一性指数を有するポリペプチド配列を有する、または含む単離ポリペプチド、および

（g）（a）から（f）のポリペプチドの断片および変種が含まれる。

【0006】

本発明のポリペプチドは、ポリペプチドのエンドグルクロニダーゼファミリーの構成要素であると考えられる。ヘパラン硫酸プロテオグリカン（HSPG）は、細胞表面、基底膜および細胞外基質（ECM）に遍在するマクロ分子である。これらは細胞 - 細胞および細胞 - 細胞外基質相互作用において主要な役割を果た

している。HSPGは成長因子(たとえば、線維芽細胞成長因子および血小板由来成長因子)、サイトカイン(たとえば、インターロイキン-2)、細胞外基質蛋白質(たとえば、フィブロネクチン、ラミニン、コラーゲン)、血液凝固に係る因子(たとえば、アンチトロンビンIII)、リポ蛋白質、DNAトポイソメラーゼ、-アミロイド蛋白質などのその他の蛋白質のような多種多様な分子と結合することが報告されている(Kjellen, L. and Lindahl, U., *Annu. Rev. Biochem.* 60, 443~475 (1991); Wight, T.N. et al., *Curr. Opin. Cell Biol.* 4, 793~801 (1992))。

【0007】

HSPGにシグナリング分子を結合すると隔離が引き起こされ、それによって接近しやすいこれらの結合分子の局在的貯留が生じ、HSPGの分解によって容易に放出することができる(Nissen, N. et al., *Biochem. J.* 338, 637~642 (1999))。さらに、HSPGはECMの重要な構成成分である。毛細管では、主に内皮下の基底膜に認められ、血管内皮を支持し、毛細管壁の構造を安定化している。通常「ヘパラーゼ」と呼ばれる(Nakajima, M. et al., *J. Biol. Chem.* 259, 2283~2290 (1984))ヘパラン硫酸(HS)分解エンドグルクロニダーゼの発現が血液によって運ばれる細胞および胎盤栄養芽細胞に発見されており、これらが炎症過程または創傷治癒、および妊娠に関連した細胞の血管外遊出活性それぞれに必要であると考えられる(Vlodavsky, I. et al., *Invasion Metastasis* 12, 112~127 (1992); Goshen, R. et al., *Mol. Hum. Reprod.* 2, 679~684 (1996))。

【0008】

HSPGのHS部分の分解は、非常に様々な生物学的プロセスに影響を与える。特に興味深いのは、悪性腫瘍に関連した新生血管形成および転移においてヘパラーゼが機能することが考えられることである。分泌されたヘパラーゼ活性は内皮細胞の有糸分裂を誘導し(Folkman, J. et al., *Am. J*

. Pathol. 13、393~400(1988); Ishai-Michaeli, R. et al., Cell. Regul. 1、833~842(1990))、いくつかのヒト転移細胞株ならびにヒト乳癌、結腸癌および肝癌の検体の転移特性と直接関連があること(Nakajima, M. et al., Science 220、611~613(1983); Vlodaysky, I. et al., Cancer Res. 43、2704-2711(1983))が示された。

【0009】

生化学的実験によって今までに、ヘパラーゼ活性には3種の別個の群、分子量137kDa(Oosta, H.G.M. et al., J. Biol. Chem. 257、11249~11255(1982))、50kDa(Freeman, C. and Parish, C.R., Biochem. J. 330、1341~13509(1998))、および32~40kDa(Hoogewerf, A.J. et al., J. Biol. Chem. 270、3268~3277(1995))が確認された。最初のほ乳類ヘパラーゼ遺伝子は50kDa型であった(Vlodaysky, I. et al., Nat. Medicine 5、793~802(1999); Hulett, M.D. et al., Nat. Medicine 5、803~809(1999); Toyoshima M. and Nakajima M., J. Biol. Chem. 270、24153~24160(1999))。このヘパラーゼ遺伝子は高転移性マウス細胞株およびヒト細胞株およびヒト腫瘍の生検材料において優先的に発現する。さらに、ヘパラーゼは転移性腫瘍を有する動物および癌患者の血清(Nakajima, M. et al., Science 220、611~613(1983))および尿において濃度が増加していることが検出された(Vlodaysky, I. et al., Nat. Medicine 5、793~802(1999))。ヘパラーゼ遺伝子を転移性の低い、または非転移性の腫瘍細胞株にトランスフェクションすると、実験マウスにおいて高い転移能力がもたらされ、死亡率の増加が引き起こされる。これに反して、実験動物をヘパラーゼ阻害剤(たとえば、非抗凝固物質の低分子量ヘパリンおよびポリ硫酸化

糖類)で処理するとメラノーマ、ルイスラットの肺癌および乳腺癌による肺転移率がかなり減少する(Vlodavsky I. et al., *Invasion Metastasis* 14、290~302(1995)、Parish, C.R. et al., *Int. J. Cancer* 40、511~517(1987))。一般にヘパラーゼ活性は多くの異なる生物学的プロセスにおいて非常に重要な役割を担っていることが受け入れられているので、この蛋白質ファミリーの他の構成要素を同定する必要があることは明らかである。

【0010】

このヘパラーゼ-2の生物学的特性は、以後「ヘパラーゼ-2の生物学的活性」または「ヘパラーゼ-2活性」と称する。本発明のポリペプチドは少なくとも1種のヘパラーゼ-2の生物学的活性を表すことが好ましい。

【0011】

本発明のポリペプチドにはまた、すべての対立型およびスプライス変種を含めた前記のポリペプチドの変種が含まれる。このようなポリペプチドは、保存的または非保存的、あるいはそれらの組合せであることが可能な挿入、欠失および置換によって参照ポリペプチドと異なっている。特に好ましい変種は、いくつか、たとえば50から30、30から20、20から10、10から5、5から3、3から2、2から1または1アミノ酸が任意の組合せで挿入、置換、または欠失したものである。

【0012】

本発明のポリペプチドの好ましい断片には、配列番号2のアミノ酸配列の少なくとも30、50または100個の隣接したアミノ酸を有するアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド、あるいは配列番号2のアミノ酸配列を切り詰めた、または欠失した少なくとも30、50または100個の隣接したアミノ酸を有するアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドが含まれる。好ましい断片は、同様の活性または改善された活性を有するものか、あるいは所望しない活性が減少したものを含めたヘパラーゼ-2の生物学的活性を媒介する生物学的活性断片である。動物、特にヒトにおいて抗原性または免疫原性である断片もまた好ましい。

【0013】

本発明のポリペプチドの断片を、ペプチド合成によって相当する完全長ポリペプチドを製造するために使用することが可能である。したがって、これらの変種は本発明の完全長ポリペプチド製造のための中間体として使用することが可能である。本発明のポリペプチドは、「成熟した」蛋白質の形態であることが可能であり、前駆体や融合蛋白質などのより大きな蛋白質の一部であることが可能である。分泌またはリーダー配列、前駆配列、精製に役立つ配列、たとえば複数のヒスチジン残基を含む追加的アミノ酸配列、あるいは組換え体を産生する間の安定性のための追加的配列を含めると有利であることが多い。

【0014】

本発明のポリペプチドは、任意の適切な方法で、たとえば天然に存在する原料、発現系を含む遺伝子操作宿主細胞からの単離（下記参照）、またはたとえば自動ペプチド合成機を使用した化学的合成法、あるいはこのような方法の組合せによって調製することができる。このようなポリペプチドの調製手段は当業界でよく理解されている。

【0015】

他の態様では、本発明はヘパラナーゼ - 2 ポリヌクレオチドに関する。このようなポリヌクレオチドには、

- (a) 配列番号1のポリヌクレオチド配列と少なくとも95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチド、
- (b) 配列番号1のポリヌクレオチドを含む単離ポリヌクレオチド、
- (c) 配列番号1のポリヌクレオチド配列と少なくとも95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する単離ポリヌクレオチド、
- (d) 配列番号1の単離ポリヌクレオチド、
- (e) 配列番号2のポリペプチド配列と少なくとも95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチド、
- (f) 配列番号2のポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチド、

(g) 配列番号2のポリペプチド配列と少なくとも95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を有する単離ポリヌクレオチド、

(h) 配列番号2のポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド、

(i) 配列番号1のポリヌクレオチド配列と比較して0.95、0.96、0.97、0.98または0.99の同一性指数を有するポリヌクレオチド配列を有するまたは含む単離ポリヌクレオチド、

(j) 配列番号2のポリペプチド配列と比較して0.95、0.96、0.97、0.98または0.99の同一性指数を有するポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を有するまたは含む単離ポリヌクレオチド、および前述のポリヌクレオチドの断片または変種であるポリヌクレオチドあるいは前述のポリヌクレオチドとその長さ全体にわたって相補的であるポリヌクレオチドが含まれる。

【0016】

本発明のポリヌクレオチドの好ましい断片には、配列番号1の配列の少なくとも15、30、50または100個の隣接したヌクレオチドを有するヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチド、あるいは配列番号1の配列を切り詰めた、または欠失した少なくとも30、50または100個の隣接したヌクレオチドを有する配列を含む単離ポリヌクレオチドが含まれる。

【0017】

本発明のポリヌクレオチドの好ましい変種には、スプライス変種、対立変種、および1種または複数の一塩基多型(SNP)を有するポリヌクレオチドを含めた多型が含まれる。

【0018】

本発明のポリヌクレオチドにはまた、配列番号2のアミノ酸配列を含むポリペプチド変種であって、いくつか、たとえば50から30、30から20、20から10、10から5、5から3、3から2、2から1または1個のアミノ酸残基が任意の組合せで置換、欠失または添加したポリペプチド変種をコードするポリヌクレオチドが含まれる。

【0019】

他の態様では、本発明は本発明のDNA配列のRNA転写物であるポリヌクレオチドを提供する。したがって、

- (a) 配列番号2のポリペプチドをコードするDNA配列のRNA転写物を含み、
- (b) 配列番号2のポリペプチドをコードするDNA配列のRNA転写物であり、
- (c) 配列番号1のDNA配列のRNA転写物を含み、または
- (d) 配列番号1のDNA配列のRNA転写物であるRNAポリヌクレオチドおよびそれらに相補的なRNAポリヌクレオチドを提供する。

【0020】

配列番号1のポリヌクレオチド配列は、AF144325と相同性を示す(Vlodavsky, I. et al., Nat. Medicine 5, 793~802(1999))。配列番号1のポリヌクレオチド配列は、配列番号2のポリペプチドをコードするcDNA配列である。配列番号2のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号1の配列をコードするポリペプチドと同一であってよく、または遺伝子コードの重複性(縮重)の結果、配列番号2のポリペプチドもコードする配列番号1以外の配列であってよい。配列番号2のポリペプチドはAAD42342と相同性および/または構造類似性を有するエンドグルクロニダーゼファミリーの他の蛋白質と関係がある(Vlodavsky, I. et al., Nat. Medicine 5, 793~802(1999))。

【0021】

本発明の好ましいポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、特に相同なポリペプチドおよびポリヌクレオチドと類似の生物学的機能/特性を有することが期待される。さらに、本発明の好ましいポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、少なくとも1種のヘパラーゼ-2活性を有する。

【0022】

本発明のポリヌクレオチドは、ヒト膀胱細胞のmRNA由来のcDNAライブ

ラリから、標準的クローニングおよびスクリーニング技術を使用して得ることが可能である(たとえば、Sambrook et al., 「Molecular Cloning, A Laboratory Manual」2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) 参照のこと)。本発明のポリヌクレオチドはまた、ゲノムDNAライブラリなどの天然材料から入手することが可能であり、またはよく知られた市販の技法を使用して合成することができる。

【0023】

本発明のポリヌクレオチドを本発明のポリペプチドの組換え体産生に使用するとき、このポリヌクレオチドは、それ自体成熟したポリペプチドのコーディング配列、あるいはリーダー配列または分泌配列、プレ-、プロ-、プレプロ蛋白質配列、その他の融合ペプチド部分をコードするものなどの他のコーディング配列を有するリーディングフレーム中の成熟ポリペプチドのコーディング配列を含むことが可能である。たとえば、融合ポリペプチドの精製を容易にするマーカー配列をコードすることができる。本発明のこの態様のある種の好ましい実施形態では、pQEベクター(Qiagen, Inc.)に使用されたような、およびGentz et al., Proc Natl Acad Sci USA (1989) 86: 821~824で記載されたようなマーカー配列は、ヘキサ-ヒスチジンペプチドまたはHA tagである。このポリヌクレオチドはまた、転写された非翻訳配列、スプライシングおよびポリアデニル化シグナル、リボソーム結合部位およびmRNAを安定化する配列などの非コーディング5'および3'配列を含むことが可能である。

【0024】

配列番号1のポリヌクレオチド配列と同一な、または同一性が十分なポリヌクレオチドは、cDNAおよびゲノムDNA用ハイブリダイゼーションプローブとして、または核酸増幅反応(たとえば、PCR)用プライマとして使用することが可能である。このようなプローブおよびプライマを使用して、完全長cDNAおよび本発明のポリヌクレオチドをコードするゲノムクローンを単離したり、配

列番号1と高い配列類似性、一般的に少なくとも95%の同一性を有する(ヒト材料からのパラログとヒト以外の種のオーソログおよびパラログをコードする遺伝子を含めた)その他の遺伝子のcDNAおよびゲノムクローンを単離したりすることができる。好ましいプローブおよびプライマは一般に少なくとも15個のヌクレオチド、好ましくは少なくとも30個のヌクレオチドを含み、少なくとも100個とはいわないまでも、少なくとも50個のヌクレオチドを有することが可能である。特に好ましいプローブは30個と50個との間のヌクレオチドを有する。特に好ましいプライマは20個と25個との間のヌクレオチドを有する。

【0025】

ヒト以外の種の相同体を含めた本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、配列番号1またはその断片、好ましくは少なくとも15個のヌクレオチドの配列を有する標識プローブで厳密なハイブリダイゼーション条件下でライブラリをスクリーニングする段階、および前記ポリヌクレオチド配列を含む完全長cDNAおよびゲノムクローンを単離する段階を含む方法によって得ることが可能である。このようなハイブリダイゼーション技法は当業者によく知られている。好ましい厳密なハイブリダイゼーション条件には、50%ホルムアミド、5xSSC(NaCl 150mM、クエン酸三ナトリウム 15mM)、リン酸ナトリウム 50mM(pH7.6)、5xデンハルト溶液、10%デキストラン硫酸、およびサケ精子せん断変性DNA 20マイクログラム/mlを含む溶液中において42℃で一晩インキュベートを行った後、約65℃で0.1xSSCでフィルタを洗浄することが含まれる。したがって、本発明にはまた、配列番号1またはその断片、好ましくは少なくとも15ヌクレオチドの配列を有する標識プローブで厳密なハイブリダイゼーション条件下でライブラリをスクリーニングすることによって得られた、好ましくは少なくとも100個のヌクレオチド配列を有する単離ポリヌクレオチドが含まれる。

【0026】

当業者なら、多くの場合、単離されたcDNA配列は不完全で、ポリペプチドをコードする領域が5'末端まで完全に伸長していないことを理解するであろう。これは、逆転写酵素、本来「プロセス性(processivity)」(重合化反応中に

鋳型に付着したままでいられる酵素の能力を決定したもの)が低い酵素で、1本鎖cDNA合成中にmRNA鋳型からDNAコピーを完全に合成できないために生じる。

【0027】

たとえば、Rapid Amplification of cDNA ends (RACE)の方法をベースとしたもののように、完全長cDNAを得るか、または短いcDNAを延長するいくつかの有用な方法があり、当業者にはよく知られている(たとえば、Frohman et al., Proc Nat Acad Sci USA 85, 8998~9002, 1988参照)。たとえば、Marathon(商標)技法(Clontech Laboratories Inc.)を例とする最近改善された技法によって、より長いcDNAの研究が非常に簡単になった。Marathon(商標)技法では、cDNAは選択した組織から抽出したmRNAおよびそれぞれの末端に連結した「アダプタ」配列から調製した。次いで、遺伝子特異的およびアダプタ特異的オリゴヌクレオチドプライマの組合せを使用して核酸増幅(PCR)を実施し、cDNAの「欠損」5'末端を増幅する。次に、「内側(nested)」プライマ、すなわち、増幅産物の内部にアニールするように設計されたプライマ(一般に、アダプタ配列のさらに3'にアニールするアダプタ特異的プライマおよび公知の遺伝子配列のさらに5'にアニールする遺伝子特異的プライマ)を使用してPCR反応を繰り返す。この反応の産物を次にDNA配列決定、およびこの産物を存在するcDNAに直接結合して完全な配列を得るか、または5'プライマ設計のための新しい配列情報を使用して別の完全長PCRを実施することによって構成された完全長cDNAによって分析することができる。

【0028】

本発明の組換えポリペプチドは、当業界で周知の方法によって、発現系を含む遺伝子操作用宿主細胞から調製することが可能である。したがって、他の態様では、本発明は本発明のポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチド類を含む発現系、このような発現系で遺伝子操作する宿主細胞、および組換え技術による本発明のポリペプチドの産生に関する。無細胞翻訳系はまた、本発明のDNA構築物が

ら得られたRNAを使用してこのような蛋白質を産生するために使用することができる。

【0029】

組換え体産生のために、宿主細胞を遺伝子操作して本発明のポリヌクレオチド用の発現系またはそれらの部分を取り込ませることができる。Davis et al.、「Basic Methods in Molecular Biology」(1986)およびSambrook et al.(同書)などの多くの標準的研究室マニュアルに記載された方法によって、ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入することが可能である。宿主細胞にポリヌクレオチドを導入する好ましい方法には、たとえば、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストランによるトランスフェクション、トランスベクション、マイクロインジェクション、陽イオン脂質によるトランスフェクション、エレクトロポレーション、トランスダクション、スクレープ負荷、バリスティック導入または感染が含まれる。

【0030】

適切な宿主の代表的な例には、Streptococci、Staphylococci、E.coli、StreptomycesおよびBacillus subtilis細胞など細菌細胞、酵母細胞およびAspergillus細胞などの真菌細胞、Drosophila S2およびSpodoptera Sf9細胞など昆虫細胞、CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK293およびBowesメラノーマ細胞など動物細胞、および植物細胞が含まれる。

【0031】

多様な発現系には、たとえば染色体、エピソームおよびウイルス由来の系、たとえば細菌プラスミド、バクテリアファージ、トランスポゾン、酵母エピソーム、挿入要素、酵母染色体要素、バキュロウイルス、SV40などのパポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルスおよびレトロウイルスなどのウイルスから得られたベクター、およびそれらの組合せから得られたベクター、たとえばプラスミドおよびバクテリオファージ遺伝

子要素から得られたもの、たとえばコスミドおよびファージミドを使用することができる。発現系には、発現を調節ならびに引き起こす制御領域を含めることが可能である。一般に、宿主においてポリペプチドを産生するためにポリヌクレオチドを維持、増殖、または発現させることができる任意の系またはベクターを使用することが可能である。たとえば、Sambrook et al.、(同書)で記載されたものなど、様々なよく知られた通常の技法のいずれかによって、適切なポリヌクレオチド配列を発現系に挿入することが可能である。適切な分泌シグナルを所望のポリペプチドに取り込ませて、翻訳蛋白質を小胞体内腔、周辺質または細胞外環境に分泌させることが可能である。これらのシグナルは、ポリペプチドに対して内在性であっても、異種シグナルであってもよい。

【0032】

スクリーニングアッセイで使用するために本発明のポリペプチドを発現させる場合、一般にポリペプチドは細胞表面で産生することが好ましい。この現象では、細胞をスクリーニングアッセイに使用する前に収集することが可能である。ポリペプチドを培地中に分泌する場合、ポリペプチドを回収、精製するために培地を回収することができる。細胞内に産生する場合、ポリペプチドを回収する前に細胞をまず溶解しなければならない。

【0033】

本発明のポリペプチドは、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィ、ホスホセルロースクロマトグラフィ、疎水性相互反応クロマトグラフィ、アフィニティクロマトグラフィ、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィおよびレクチンクロマトグラフィを含めた周知の方法によって組換え細胞培養物から回収および精製することができる。高速液体クロマトグラフィを精製に使用することが最も好ましい。ポリペプチドが細胞内合成、単離および/または精製中に変性したとき、蛋白質を再生する周知の技法を使用して、活性構造を再生することが可能である。

【0034】

本発明のポリヌクレオチドは、診断薬として、関連遺伝子における変異の検出に使用することが可能である。cDNAまたはゲノム配列内の配列番号1のポリ

ヌクレオチドによって特徴付けられ、機能不全に関連する遺伝子の変異型を検出することによって、遺伝子の発現不足、過剰発現または位置的变化または一時的発現によって引き起こされた疾患、または疾患に対する罹患性の診断を含めまたは定義することができる診断手段がもたらされるだろう。遺伝子内に存在する個々の変異を、当業界で周知の様々な技法によってDNAレベルで検出することが可能である。

【0035】

診断用核酸は、患者の細胞、たとえば血液、尿、唾液、組織生検または剖検材料から得ることが可能である。ゲノムDNAは検出のために直接使用するか、あるいは分析前にPCR、好ましくはRT-PCR、またはその他の増幅技術を使用することによって酵素的に増幅することができる。RNAやcDNAも同様に使用することができる。欠失および挿入は、通常の遺伝子型と比較した増幅産物の大きさの変化によって検出することができる。点突然変異は、増幅したDNAを標識したヘパラーゼ-2ヌクレオチド配列とハイブリダイズさせることによって確認することができる。完全に一致した配列は、RNアーゼ消化によって、または融解温度の違いによって一致しない2本鎖から区別することができる。DNA配列の違いはまた、変性剤を含めた、または含めないゲル内を移動するDNA断片の電気泳動移動度の変化によって、または直接DNA配列を決定することによって検出することが可能である(たとえば、Myers et al., Science (1985) 230:1242参照)。特定の位置における配列の変化はまた、RNアーゼおよびS1保護などのヌクレアーゼ保護アッセイまたは化学的切断法によって(Cotton et al., Proc Natl Acad Sci USA (1985) 85:4397~4401参照)明らかにすることが可能である。

【0036】

ヘパラーゼ-2ポリヌクレオチド配列またはその断片を含むオリゴヌクレオチドプローブのアレイを組み立てて、たとえば遺伝子変異のスクリーニングを効率的に実施することができる。このようなアレイは、高密度アレイまたはグリッドが好ましい。アレイ技法はよく知られていて、一般的に応用されており、遺伝

子発現、遺伝子結合、および遺伝子変動性を含めた分子遺伝学における様々な問題を処理するために使用することができ、たとえば、M. Chee et al.、Science、274、610~613(1996)およびその中で引用されたその他の参考文献を参照されたい。

【0037】

ポリペプチドまたはmRNAの発現レベルの異常な減少または増加の検出はまた、患者の本発明の疾患に対する罹患性を診断または決定するために使用することができる。発現の減少または増加は、当業界で周知のポリヌクレオチドを定量するいずれかの方法、たとえば核酸増幅法、たとえばPCR、RT-PCR、RNAアーゼ保護、ノザンプロットイングおよびその他のハイブリダイゼーション法などを使用してRNAレベルで決定することができる。宿主から得られた試料中における本発明のポリペプチドなど蛋白質の濃度を決定するために使用することができるアッセイ方法は、当業者には周知である。このようなアッセイ法には、ラジオ免疫アッセイ、競合結合アッセイ、ウェスタンブロット分析およびELISAアッセイが含まれる。

【0038】

したがって、他の態様では、本発明は、
(a) 本発明のポリヌクレオチド、好ましくは配列番号1のヌクレオチド配列、またはその断片またはRNA転写物、
(b) (a)の配列に相補的なヌクレオチド配列、
(c) 本発明のポリペプチド、好ましくは配列番号2のポリペプチド、またはその断片、あるいは
(d) 本発明のポリペプチド、好ましくは配列番号2のポリペプチドに対する抗体を含む診断キットに関する。

【0039】

このようなキットでは、(a)、(b)、(c)または(d)は実施的な成分を含むことが可能であることが理解されよう。このようなキットは、疾患または疾患に対する罹患性、特に他のものの中でも本発明の疾患の診断に有用であろう。

。

【0040】

本発明のポリヌクレオチド配列は、染色体位置研究に重要である。この配列は、特異的に個々のヒト染色体上の特定の位置を標的として、ハイブリダイズすることができる。本発明によって染色体に関連する配列のマッピングは、これらの配列と遺伝子関連疾患とを相関させるために重要な第1段階である。一旦配列が正確な染色体位置にマッピングされると、染色体上のその配列の物理的位置を遺伝子マップデータと関連づけることができる。このようなデータは、たとえばV. McKusick、「Mendelian Inheritance in Man」(Johns Hopkins University Welch Medical Libraryからオンラインで入手できる)に見いだされる。次に、同じ染色体領域にマッピングされた遺伝子と疾患の関連は、結合分析(物理的に隣接した遺伝子の同時遺伝)によって確認される。ゲノム配列(遺伝子断片など)の正確なヒト染色体位置は、Radiation Hybrid (RH) マッピング(Walter, M. Spillett, D., Thomas, P., Weissenbach, J., and Goodfellow, P., (1994)「A method for constructing radiation hybrid maps of whole genomes, Nature Genetics 7, 22~28)を使用して決定することができる。いくつかのRHパネルがResearch Genetics (Huntsville, AL, USA)、たとえば、GeneBridge4 RHパネル(Hum Mol Genet 1996 Mar; 5(3): 339~46「A radiation hybrid map of the human genome」, Gyapay G, Schmitt K, Fizames C, Jones H, Vega-Czarny N, Spillett D, Muselet D, Prud'Homme JF, Dib C, Auffray C, Morissette J, Weissenbach J, Goodfellow PN)から入手できる。このパネルを使用して遺伝子の染色体位置を決定するために、RH DNA上の関心のある遺伝子から設計されたプライマを使用して93 PCRを実施する。これらのDNAそれぞれには、ハムスター

ベース（ヒト/ハムスターハイブリッド細胞株）に維持されたランダムなヒトゲノム断片が含まれる。これらのPCRによって、関心のある遺伝子のPCR産物の有無を示す93スコアが得られる。これらのスコアを公知の位置のゲノム配列から得られたPCR産物を使用して生じたスコアと比較する。この比較は <http://www.genome.wi.mit.edu/> で実施する。

【0041】

本発明のポリヌクレオチド配列はまた、組織での発現研究に重要な手段である。このような研究によって、本発明のポリヌクレオチドの発現パターンの決定が可能で、それらをコードするmRNAを検出することによって、組織中におけるコードされたポリペプチドの発現パターンに関する示唆を得ることが可能である。使用した技法は当業界で公知で、cDNAマイクロアレイハイブリダイゼーション (Schena et al., Science, 270, 467~470、1995およびShalon et al., Genome Res, 6, 639~645、1996) およびPCRなどヌクレオチド増幅技法などのグリッド上に配列したクローンに対するin situハイブリダイゼーション技法が含まれる。好ましい方法では、Perkin Elmer製のTAQMAN法（商標）を使用する。これらの研究の結果によって、生体中におけるポリペプチドの通常の機能を示すことができる。さらに、mRNAの通常の発現パターンを同遺伝子の別の形態（たとえば、可能なポリペプチドコードを改変したものや調節変異体）によってコードされたmRNAの発現パターンと比較することによって、本発明のポリペプチドの役割、または疾患で発現が不適切になった本発明のポリペプチドの役割について重要な示唆を与えることができる。このような不適切な発現は、一時的、部分的であり、または簡単に定量できる性質である可能性がある。

【0042】

本発明のポリペプチドは、血液細胞、癌組織、胎児肝、リンパ節、胎盤、脾臓、栄養芽細胞で発現する。

【0043】

本発明の他の態様は、抗体に関する。本発明のポリペプチドまたはその断片、

またはそれらを発現する細胞は、免疫源として使用して本発明のポリペプチドに対して免疫特異的な抗体を産生することができる。「免疫特異的」という用語は、従来技術のその他の関連するポリペプチドに対する親和性よりも、本発明のポリペプチドに対する親和性の方が実質的に高い抗体を意味する。

【0044】

本発明のポリペプチドに対して生じた抗体は、通常の方法を使用して、ポリペプチドまたはエピトープを有する断片、あるいは細胞を動物、好ましくはヒト以外の動物に投与することによって得ることが可能である。モノクローナル抗体の調製では、連続細胞株培養物によって産生した抗体を提供する任意の方法を使用することができる。例として、ハイブリドーマ法(Kohler, G. and Milstein, C., Nature (1975) 256:495~497)、トリオーマ法、ヒトB細胞ハイブリドーマ法(Kozbor et al., Immunology Today (1983) 4:72)およびEBV-ハイブリドーマ法(Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, 77~96, Alan R. Liss, Inc., 1985)が含まれる。

【0045】

米国特許第4946778号に記載されたものなど、1本鎖抗体の産生方法はまた、本発明のポリペプチドに対する1本鎖抗体を産生するために適合させることができる。また、トランスジェニックマウス、またはその他のほ乳類を含めたその他の生物を使用してヒト化抗体を発現することが可能である。

【0046】

前記の抗体を使用して、ポリペプチドを発現するクローンを単離また同定したり、アフィニティクロマトグラフィによってポリペプチドを精製したりすることが可能である。本発明のポリペプチドに対する抗体はまた、中でも本発明の疾患の治療に使用することが可能である。

【0047】

本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドはまた、ワクチンとして使用することが可能である。したがって、本発明は他の態様において、たとえばサイト

カイン産生T細胞または細胞毒T細胞を含む、抗体および/またはT細胞の免疫応答を生じさせるために適切なほ乳類に本発明のポリペプチドを接種し、疾患が既に個体に定着しているかどうかにかかわらず前記動物を疾患から防御することを含めた、ほ乳類における免疫学的応答を誘導する方法に関する。本発明の疾患から前記動物を防御する抗体を産生するような免疫応答を誘導するために、*in vivo*でこのポリヌクレオチドを発現し、ポリペプチドをコーディングすることを目的としたベクターを介して、本発明のポリペプチドを送達すること含む方法によって、ほ乳類における免疫学的応答はまた誘導することが可能である。ベクターを投与する一方法は、粒子上のコーティングとして、またはその他の方法で所望の細胞に加速する方法である。このような核酸ベクターには、DNA、RNA、修飾核酸、またはDNA/RNAハイブリッドを含めることが可能である。ワクチンを使用する場合、ポリペプチドまたは核酸ベクターは通常ワクチン製剤（組成物）としてもたらされる。この製剤にはさらに適切な担体が含まれる。ポリペプチドは胃内で分解されるので、非経口的に（たとえば、皮下、筋肉内、静脈内、または皮内注射によって）投与することが好ましい。非経口投与に適した製剤には、抗酸化剤、緩衝液、静菌薬および製剤を受容体の血液とインストニックにするための溶質を含むことが可能な水性および非水性無菌注射溶液、ならびに懸濁剤および増粘剤を含むことが可能な水性および非水性無菌懸濁液が含まれる。この製剤は、たとえば密閉アンプルおよびバイアルといった1回用量または複数回用量容器に存在させることが可能で、使用直前に無菌液体担体を添加することのみが必要とされる凍結乾燥状態で保存することが可能である。このワクチン製剤にはまた、水中油型系および当業界で公知のその他の系など、製剤の免疫原性を増強するアジュバント系を含めることが可能である。用量は、ワクチンの比活性に左右され、通常の実験によって容易に決定することができる。

【0048】

本発明のポリペプチドは、1種または複数の病態、特に前記の本発明の疾患に関連した1種または複数の生物学的機能を有する。したがって、このポリペプチドの機能または濃度を刺激または阻害する化合物を同定するために有用である。したがって、他の態様では、本発明はこのポリペプチドの機能または濃度を刺激

または阻害する化合物を同定するために化合物をスクリーニングする方法を提供する。このような方法によって、前述のような本発明の疾患を治療または予防する目的のために使用することが可能なアゴニストまたはアンタゴニストが同定される。化合物は、様々な原料、たとえば細胞、無細胞調製物、化学薬品ライブラリ、化学的化合物の収集物、および天然産物の混合物から同定することが可能である。このように同定されたアゴニストまたはアンタゴニストは、場合によってはポリペプチドの天然または変更された物質、リガンド、レセプタ、酵素など、それらの構造もしくは機能的類似物 (Coligan et al., *Current Protocols in Immunology* 1(2): Chapter 5 (1991)) または小分子であることが可能である。

【0049】

スクリーニング方法では、候補となる化合物に直接または間接に関連した標識によって、候補となる化合物と、ポリペプチド、ポリペプチドを有する細胞または膜、あるいはそれらの融合蛋白質との結合を簡単に決定することが可能である。あるいは、このスクリーニング方法には標識競合物質 (たとえば、アゴニストまたはアンタゴニスト) と候補化合物のポリペプチドへの競合結合を (定性的または定量的に) 決定または検出することを含むことが可能である。さらに、これらのスクリーニング方法では、ポリペプチドを有する細胞に適切な検出系を使用して、候補となる化合物がこのポリペプチドを活性化または阻害することによって生じるシグナルを起こさせることができるかどうかを試験することが可能である。活性化の阻害剤は、一般に公知のアゴニストの存在下でアッセイされ、候補化合物の存在下でアゴニストによる活性化に対する効果が観察される。さらに、スクリーニング法は単純に、混合物を形成するために候補化合物を本発明のポリペプチドを含む溶液と混合する段階、この混合物中のヘパラーゼ - 2 活性を決定する段階、および候補化合物を含まない対照混合物とこの混合物のヘパラーゼ - 2 の活性を比較する段階を含むことが可能である。

【0050】

本発明のポリペプチドは、通常のパフォーマンスの低いスクリーニング法およびハイスループットスクリーニング (HTS) 法でも使用することが可能である。このよう

なHTS法には、よく確立された96ウェル、さらに最近では384ウェルマイクロタイタープレートの使用だけでなく、Schullek et al、Anal Biochem、246、20~29(1997)によって記載されたナノウェル法などの新しい方法もまた含まれる。

【0051】

前述のように、Fc部分およびヘパラーゼ-2ポリペプチドから形成されたものなど融合蛋白質はまた、ハイスループットスクリーニングアッセイで使用して本発明のポリペプチドのアンタゴニストを同定することができる(D. Bennett et al、J Mol Recognition、8:52~58(1995)、およびK. Johanson et al、J Biol Chem、270(16):9459~9471(1995)参照)。

【0052】

スクリーニング技法

ポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび本発明のポリペプチドに対する抗体はまた、細胞内で添加した化合物のmRNAおよびポリペプチドの産生に対する影響を検出するためのスクリーニング方法を構成するために使用することが可能である。たとえば、ELISAアッセイは当業界で公知の標準的な方法によってモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を使用して分泌した、または細胞に関連したポリペプチドの濃度を決定するために作製することが可能である。これは、適切に操作された細胞または組織からのポリペプチドの産生を阻害または促進することが可能な薬剤(それぞれ、アンタゴニストまたはアゴニストとも呼ばれる)を発見するために使用することができる。

【0053】

本発明のポリペプチドを使用して、もしあるならば、当業界で公知の標準的レセプタ結合技術によって、膜結合レセプタまたは溶解性レセプタを確認することが可能である。これらには、限定はしないが、ポリペプチドを放射活性アイソトープ(たとえば、¹²⁵I)で標識するか、または化学修飾(たとえば、ビオチン化)するか、または検出もしくは精製に適したペプチド配列と融合して、レセプタと見なされる原料(細胞、細胞膜、細胞上清、組織抽出物、体液)とインキュ

ベートするリガンド結合アッセイおよび架橋結合アッセイが含まれる。その他の方法には、表面プラズモン共鳴および分光法など生物物理学的技法が含まれる。これらのスクリーニング法はまた、もしあるならば、ポリペプチドの受容体への結合と競合するポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストを同定するために使用することが可能である。このようなアッセイを実施するための標準的方法は当業界でよく知られている。

【0054】

本発明のポリペプチドのアンタゴニストの例には、抗体、あるいはいくつかの場合では、オリゴヌクレオチドまたは場合によってはこのポリペプチドのリガンド、基質、レセプタ、酵素などに密接に関係した蛋白質、たとえば、リガンド、基質、レセプタ、酵素などの断片、あるいは本発明のポリペプチドに結合するが応答は起こさず、したがってポリペプチドの活性を妨害する小分子が含まれる。

【0055】

スクリーニング法はまた、トランスジェニック法およびヘパラナーゼ - 2 遺伝子の使用を含む。トランスジェニック動物を構築する技術はよく確立されている。たとえば、ヘパラナーゼ - 2 遺伝子は、受精した卵母細胞の雄生殖核へのマイクロインジェクションによって、移植前後の胚へのレトロウイルス移入によって、またはエレクトロポレーションなどにより遺伝子的に変更した宿主胚盤胞への胚芽幹細胞の注射によって導入することが可能である。特に有用なトランスジェニック動物は、動物遺伝子とその動物のゲノム内でヒトの同等遺伝子と置き換えた、いわゆる「ノックイン」動物である。ノックイントランスジェニック動物は、化合物がヒト標的に特異的な場合、標的を確認する創薬プロセスにおいて有用である。その他の有用なトランスジェニック動物は、細胞内の内在性DNA配列によってコードされている本発明のポリペプチドの動物オースログの発現が部分的、または完全に消失した、いわゆる「ノックアウト」動物である。この遺伝子ノックアウトは技術の限定によって特定の細胞または組織を標的とすることが可能であるか、あるいはある種の細胞または組織のみ、あるいは動物のすべて、または実質的にすべての細胞で生じさせることが可能である。またトランスジェニック動物の技術によって、導入された遺伝子が発現して本発明のポリペプチドを

大量にもたらす全動物発現 - クローニング系も提供される。

【0056】

前述の方法で使用するスクリーニングキットは、本発明の他の態様を形成する。このようなキットには、

- (a) 本発明のポリペプチド、
- (b) 本発明のポリペプチドを発現する組換え細胞、
- (c) 本発明のポリペプチドを発現する細胞膜、または
- (d) 本発明のポリペプチドの抗体を含み、このポリペプチドは配列番号2が好ましい。

【0057】

このようなキットでは、(a)、(b)、(c)または(d)は実質的な成分を含むことが可能であることは理解されよう。

【0058】

(用語)

以下の定義は、今までにしばしば使用されたある種の用語の理解を容易にするために挙げる。

【0059】

本明細書で使用した「抗体」には、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、キメラ抗体、1本鎖抗体、およびヒト化抗体、ならびにFabまたはその他のイムノグロブリン発現ライブラリの産物を含めたFab断片が含まれる。

【0060】

「単離された」とは、「人の手によって」天然の状態から変化したことを意味しており、天然に生じるならば、その元の環境から変化させたり、除去したりすること、またはその両方である。たとえば、生きた生体に天然に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは「単離されて」いないが、天然の状態に共存する物質から分離された同一のポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、この用語が本明細書で使用されるように、「単離されて」いる。さらに、形質転換、遺伝子操作またはその他の組換え方法によって生体に導入されたポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、前記生体にまだ存在していても、生体が生きていても生き

ていなくても、単離されている。

【0061】

「ポリヌクレオチド」とは、一般に修飾されていない、または修飾されたRNAまたはDNAであることが可能なポリリボヌクレオチド(RNA)またはポリデオキシリボヌクレオチド(DNA)のことである。「ポリヌクレオチド」には、限定はしないが、1本鎖および2本鎖DNA、1本鎖および2本鎖領域の混合物であるDNA、1本鎖および2本鎖RNA、および1本鎖および2本鎖領域の混合物であるRNA、1本鎖またはより一般的には2本鎖、あるいは1本鎖および2本鎖領域の混合物であることが可能なDNAおよびRNAを含んだハイブリッド分子が含まれる。さらに、「ポリヌクレオチド」とは、RNAまたはDNAあるいはRNAおよびDNAの両者を含む3本鎖領域を意味する。「ポリヌクレオチド」という用語にはまた、1種または複数の修飾された塩基を含むDNAまたはRNA、および安定性のためまたはその他の理由で修飾された主鎖を有するDNAまたはRNAが含まれる。「修飾された」塩基には、たとえば、トリチル化塩基およびイノシンなどの通常ではない塩基が含まれる。様々な修飾をDNAおよびRNAに施すことが可能である。したがって、「ポリヌクレオチド」には、化学的、酵素的または代謝的に修飾された、一般的に天然に見いだされるポリヌクレオチドの形態、ならびにウイルスおよび細胞に特有のDNAおよびRNAの化学的形態が含まれる。「ポリヌクレオチド」にはまた、しばしばオリゴヌクレオチドと称される比較的短いポリヌクレオチドが含まれる。

【0062】

「ポリペプチド」とは、ペプチド結合または修飾されたペプチド結合によって互いに結合した2個以上のアミノ酸を含むポリペプチド、すなわち、ペプチド同配体のことである。「ポリペプチド」とは、一般的にペプチド、オリゴペプチドまたはオリゴマーを意味する短鎖、および一般的に蛋白質を意味する長鎖の両者を意味する。ポリペプチドには、遺伝子でコードされた20個のアミノ酸以外のアミノ酸が含まれることが可能である。「ポリペプチド」には、翻訳後のプロセッシングなど天然のプロセス、または当業界で公知の化学的修飾技法のいずれかによって修飾されたアミノ酸配列が含まれる。このような修飾方法については、基

本的な参考書およびより詳細な研究論文、ならびに膨大な研究文献に詳しく説明されている。ペプチド主鎖、アミノ酸側鎖およびアミノ末端またはカルボキシル末端を含めたポリペプチドの任意の場所に修飾を行うことが可能である。同様の種類の修飾を所与のポリペプチドのいくつかの部位に同程度または異なる程度で存在させることが可能であることが理解されよう。また、1種の所与のポリペプチドが多くの種類の修飾を含むことが可能である。ポリペプチドは、ユビキチン化の結果として枝分かれすることが可能で、枝分かれを有する、または有さない環状であることが可能である。環状、枝分かれおよび枝分かれ環状ポリペプチドは、翻訳後の天然のプロセスから生じるか、または合成法によって作製することが可能である。修飾には、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、ビオチン化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスホチジルイノシトールの共有結合、架橋結合、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有架橋結合の形成、シスチンの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化ガンマカルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、蛋白分解処理、リン酸化、ブレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、運搬RNAによるアルギニル化などアミノ酸の蛋白質への添加、およびユビキノン化が含まれる(たとえば、「Proteins - Structure and Molecular Properties」2版、T.E.Creighton、W.H.Freeman and Company、New York、1993;Wold、F.、「Post-translational Protein Modifications: Perspectives and Prospects」、Post-translational Covalent Modification of Proteins、B.C.Johnson編、Academic Press、New York、1983の1~12、;Seifter et al.、「Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors」、Meth Enzymol、182、626~646、1990、Rattan et a

1.、「Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging」、Ann NY Acad Sci、663、48~62、1992参照のこと)。

【0063】

ポリペプチド配列の「断片」とは、参照配列よりも短い、参照ポリペプチドと本質的に同一の生物学的機能または活性を保持するポリペプチド配列のことである。ポリヌクレオチド配列の「断片」とは、配列番号1の参照配列よりも短いポリヌクレオチド配列のことである。

【0064】

「変種」とは、参照ポリヌクレオチドまたはポリペプチドとは異なるが、それらの本質的な特性を保持するポリヌクレオチドまたはポリペプチドのことである。ポリヌクレオチドの一般的な変種は、参照ポリヌクレオチドとはヌクレオチド配列が異なる。変種のヌクレオチド配列が変化すると、参照ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列が変化するかもしれないし、しないかもしれない。ヌクレオチドの変化によって、以下に論じるように、対照配列によってコードされたポリペプチドのアミノ酸の置換、付加、欠失、融合または切り詰めが引き起こされる。一般的なポリペプチドの変種は、参照ポリペプチドとはアミノ酸配列が異なる。一般に、参照ポリペプチドおよび変種の配列は全体にわたって非常に類似し、多くの領域が同一であるように変化が限定されている。変種および参照ポリペプチドは、1種または複数の置換、挿入、欠失が組み合わせることによってアミノ酸配列が異なる可能性がある。置換または挿入されたアミノ酸残基は、遺伝子コードによってコードされたものであってもよいし、そうでなくてもよい。一般的に保存される置換には、Gly、Ala；Val、Ile、Leu；Asp、Glu；Asn、Gln；Ser、Thr；Lys、Arg；PheおよびTyrが含まれる。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの変種は対立遺伝子など天然に生じることが可能であるが、あるいは天然には生じることが知られていない変種であってもよい。ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの天然にはない変種は、変位誘発法または直接合成法によって作製することが可能である。変種にはまた、1種または複数の翻訳後の変更、たとえば、グ

リコシル化、リン酸化、メチル化、ADPリボシル化などを有するポリペプチドが含まれる。実施形態には、N末端アミノ酸のメチル化、セリンおよびトレオニンのリン酸化およびC末端グリシンの変更が含まれる。

【0065】

「対立遺伝子」とは、ゲノムの所与の遺伝子座にある遺伝子の2種以上の異なる型のうちの1つのことである。

【0066】

「多型」とは、集団内のゲノムの所与の位置のヌクレオチド配列（および、関係があるならば、コードされたポリペプチド配列）の変異体のことである。

【0067】

「一塩基多型」（SNP）とは、集団内のゲノムの1つのヌクレオチドの位置にヌクレオチド変異が生じることである。SNPはゲノムの遺伝子内、または遺伝子間領域に生じる可能性がある。SNPは対立遺伝子特異的増幅（ASA）を使用してアッセイすることができる。この方法には、少なくともプライマが3個必要である。アッセイする多型に対する逆相補に通常のプライマを使用する。この通常のプライマは、多型塩基から50と1500塩基対の間であることが可能である。他の2個（以上の）プライマは、多型を形成する2個（以上の）対立遺伝子の1つに合致するように最後の3'塩基が変化する以外は互いに同一である。次いで、通常のプライマおよび対立遺伝子特異的プライマの1個をそれぞれ使用して、2種（以上の）PCR反応を試料DNAに実施する。

【0068】

本明細書では「スプライス変種」は、同一のゲノムDNA配列から最初に転写されたRNA分子から産生されるが、別のRNAスプライシングを受けたcDNA分子のことである。別のRNAスプライシングは、一般的にイントロンを除去するために、一次RNA転写物がスプライシングを受けるときに生じ、それぞれが異なるアミノ酸配列をコードすることが可能な1個以上のmRNA分子の産生をもたらす。スプライシング変種という用語はまた、前記cDNA分子によってコードされる蛋白質を意味する。

【0069】

「同一性」とは、配列を比較することによって決定される2個以上のポリペプチド配列または2個以上のポリヌクレオチド配列の関係を意味する。一般に、同一とは、2種のポリヌクレオチドまたは2種のポリペプチド配列それぞれのヌクレオチドとヌクレオチド、またはアミノ酸とアミノ酸が、比較する配列の全長にわたって厳密に一致していることを意味する。

【0070】

「%同一性」 - 厳密に一致しない配列では、「%同一性」を決定することが可能である。一般に、配列間の相互関係が最大になるように比較する2種の配列を並べる。整合の程度を高めるためには、片方、または両方の配列に「ギャップ」を挿入することが含まれる。%同一性は、比較する配列それぞれの全長にわたって決定すること（いわゆるグローバルアラインメント）が可能で、これは特に同一または非常に類似した長さの配列に適しており、またはより短い、限定された長さ（いわゆるローカルアラインメント）について決定することも可能で、これは長さが等しくない配列により適している。

【0071】

「類似性」とは、2種のポリペプチド配列間の関係をさらに高い程度で決定したものである。一般に、「類似」とは、（同一に関する限りは）比較する配列それぞれの残基対間の厳密な一致だけでなく、厳密に一致しない場合は、進化に基づいて1残基がその他のもので置換されることが可能かどうかについて考慮して、残基毎をベースにして2本のポリペプチド鎖のアミノ酸の間で比較することを意味している。これは、後で2種の配列の「%類似性」を決定することが可能な関連「スコア」を有することが可能である。

【0072】

2種以上の配列の同一性および類似性を比較する方法は、当業界では周知である。したがって、たとえばWisconsin Sequence Analysis Package、version 9.1 (Devereux J et al、Nucleic Acids Res、12、387~395、1984、Genetics Computer Group、Madison (Wisconsin、USA) 製) で入手できるプログラム、たとえばBESTFI

TおよびGAPプログラムを使用して、2ポリヌクレオチド間の%同一性および2ポリペプチド配列間の%同一性および%類似性を決定することが可能である。BESTFITでは、Smith and Watermanの「局所的相同性」アルゴリズム(J Mol Biol、147、195~197、1981、Advances in Applied Mathematics、2、482~489、1981)を使用し、2配列間の最も類似した1領域を発見する。BESTFITは、長さが異なる2種のポリヌクレオチドまたは2種のポリペプチド配列を比較するのに適しており、このプログラムは短い配列が長い配列の一部であると仮定している。比較すると、Neddleman and Wunschのアルゴリズム(J Mol Biol、48、443~453、1970)では、GAPによって2配列が並べられ、「最大の類似性」が発見される。GAPは、ほぼ同じ長さで、全体の長さにわたってアラインメントが予測される配列の比較により適している。プログラムそれぞれで使用されるパラメータ「Gap Weight」および「Length Weight」はそれぞれ、ポリヌクレオチド配列では50および3、ポリペプチド配列では12および4が好ましい。比較した2配列が最適にアラインメントしたとき、%同一性および類似性を決定することが好ましい。

【0073】

配列間の同一性および/または類似性を決定するその他のプログラムはまた、当業界において公知であり、たとえばBLASTファミリープログラム(Altschul S F et al、J Mol Biol、215、403~410、1990、Altschul S F et al、Nucleic Acids Res.、25:389~3402、1997、the National Center for Biotechnology Information(NCBI)(Bethesda、Maryland、USA)製、およびNCBIのホームページ、www.ncbi.nlm.nih.govからアクセス可能)およびFASTA(Pearson W R、Methods in Enzymology、183、63~99、1990; Pearson W R and Lipman D J、Proc Nat Acad S

ci USA、85、2444~2448、1988、Wisconsin Sequence Analysis Packageの一部として入手可能)がある。

【0074】

BLOSUM62アミノ酸置換マトリックス(Henikoff S and Henikoff J G、Proc.Nat.Acad.Sci.USA、89、10915~10919、1992)は、比較の前にヌクレオチド配列をまずアミノ酸配列に翻訳する場合を含めたポリペプチド配列の比較において使用することが好ましい。

【0075】

BESTFITプログラムは、参照ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列に関して、問題としているポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の%同一性を決定するために使用することが好ましく、問題の配列および対照配列は最適に並べられ、プログラムのパラメータは以下に説明するようにデフォルト値に設定される。

【0076】

「同一性指標」は、候補配列(ポリヌクレオチドまたはポリペプチド)と対照配列とを比較するために使用することが可能な配列関連の決定値である。したがって、たとえば、参照ポリヌクレオチド配列に対して、たとえば同一性指標0.95を有する候補ポリヌクレオチド配列は、その候補ポリヌクレオチド配列が対照配列の100ヌクレオチドごとに平均5までの差異を含むことが可能であること以外は対照配列と同一である。このような差異は、少なくとも1個のヌクレオチド欠失、転位および転換を含めた置換、または挿入から成る群から選択される。これらの差異は、参照ポリヌクレオチド配列の5'または3'末端位置あるいはこれらの末端位置間のどこかに、対照配列のヌクレオチド中で個別に、あるいは対照配列内に1個または複数の隣接した群で散在して生じることが可能である。言い換えると、参照ポリヌクレオチド配列に対して同一性指標0.95のポリヌクレオチド配列を得るために、前述のように対照配列中のヌクレオチド100個毎に平均5までの欠失、置換または挿入、あるいはそれらの組合せが生じるこ

とが可能である。同様のことが、必要に応じて変更を加えて、その他の値の同一性指標、たとえば0.96、0.97、0.98および0.99に当てはめられる。

【0077】

ポリペプチドについても同様で、たとえば参照ポリペプチド配列に対して同一性指標0.95を有する候補ポリペプチド配列は、その候補ポリペプチド配列が対照配列の100アミノ酸ごとに平均5までの差異を含むことが可能であること以外は対照配列と同一である。このような差異は、少なくとも1個のアミノ酸欠失、保存的および非保存的置換を含めた置換、または挿入から成る群から選択される。これらの差異は、参照ポリペプチド配列のアミノ末端またはカルボキシ末端位置あるいはこれらの末端位置間のどこかに、対照配列のアミノ酸中で個別に、あるいは対照配列内に1個または複数の隣接した群で散在して生じることが可能である。言い換えると、参照ポリペプチド配列に対して同一性指標0.95のポリペプチド配列を得るために、前述のように対照配列中のアミノ酸100個毎に平均5までの欠失、置換または挿入、あるいはそれらの組合せが生じることが可能である。同様のことが、必要に応じて変更を加えて、その他の値の同一性指標、たとえば0.96、0.97、0.98および0.99に当てはめられる。

【0078】

ヌクレオチドまたはアミノ酸の差異の数と同一性指標との間の関係は、以下の式によって表すことができる。

$$n_a = x_a - (x_a \cdot I)$$

式中、 n_a はヌクレオチドまたはアミノ酸の差異の数であり、

x_a は配列番号1または配列番号2それぞれのヌクレオチドまたはアミノ酸の全数であり、

I は同一性指標であり、

\cdot は乗法演算の印であり、かつ

x_a と I の積が整数でないときは、 x_a から減じる前に最も近い整数に切り下げる

。

【0079】

「相同」とは、対照配列に対する配列関連性の程度が高いポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列を示唆するための当業界で使用される遺伝子関連用語である。このような関連性は、前記で定義した2配列間の同一性および/または類似性の程度を決定することによって定量することが可能である。この遺伝子関連用語には「オルソログ」および「パラログ」という用語も含まれる。「オルソログ」とは、別の種で機能的に等価な (equivalent) ポリヌクレオチドまたはポリペプチドであるポリヌクレオチドまたはポリペプチドのことである。「パラログ」とは、機能的に類似した同種内のポリヌクレオチドまたはポリペプチドのことである。

【0080】

「融合蛋白質」とは、関連のない、2種の融合遺伝子またはそれらの断片によってコードされた蛋白質のことである。実例が米国特許第5541087号、第5726044号に開示されている。Fc-ヘパラーゼ-2の場合、融合蛋白質の一部としてイムノグロブリンのFc領域を使用することが、Fc-ヘパラーゼ-2またはヘパラーゼ-2の断片の機能的発現を実施するため、治療に使用するときこのような融合蛋白質の薬物動態特性を改善するため、およびヘパラーゼ-2の二量体を作製するために有利である。Fc-ヘパラーゼ-2 DNA構築物には、5'から3'方向へ、分泌カセット、すなわちほ乳類細胞から運び出すきっかけとなるシグナル配列、融合相手であるイムノグロブリンFc領域断片をコードするDNA、およびヘパラーゼ-2またはその断片をコードするDNAが含まれる。用途によっては、接触していない融合蛋白質の残部を切り離して、または発現後Fc部分を完全に削除して、Fcの機能側を変異させることによって本来の機能特性(補体結合性、Fcレセプタ結合性)を変化できることが望ましいだろう。

【0081】

限定はしないが特許および特許出願を含めた、本明細書で引用した発行物および参考文献はすべて、個々の発行物または参考文献が具体的かつ個々に、完全に記載されたものとして本明細書に参考として援用されることを示すかのように、その全体が参考として本明細書に援用される。この出願が優先権を主張する特許

出願はまた、発行物および参考文献に対して前述した方式で、その全体が本明細書に参考として援用される。

(図)

図1

定量的リアルタイム逆転写酵素 - ポリメラーゼ連鎖反応 (Taq - Man) を使用した (ヘパラーゼ - 2) Hep - 2 の *in vivo* 発現に関する定量

図2

Hep - 2 は、様々な腫瘍組織で発現する。(- アクチンを基準とした) ヘパラーゼ - 2 の相対発現の定量に定量的リアルタイム逆転写酵素 - ポリメラーゼ連鎖反応を使用した。

【0082】

図3

293 ヒト腎繊維芽細胞におけるヘパラーゼ - 2 (Hep - 2) の発現。

【0083】

抗V5 - HRP抗体を使用したウェスタンブロット分析。レーン1 (対照)、p c D N A 3 / T R A F - H i s で一時的にトランスフェクトした293細胞の細胞溶解物;レーン2 (- g a l)、p c D N A 3 . 1 / l a c Z - V 5 - H i s で一時的にトランスフェクトした293細胞の細胞溶解物;レーン3 (Hep - 2)、p c D N A 3 . 1 / H e p - 2 - V 5 - H i s で一時的にトランスフェクトした293細胞の細胞溶解物。

(他の実施例)

実施例1

R T - P C R

in vivo 発現を定量的リアルタイム逆転写酵素 - ポリメラーゼ連鎖反応 (R T - P C R) を使用して評価した。R T - P C R アッセイとして、Taq - Man 蛍光法 (A B I P R I S M 7 7 0 0 S e q u e n c e d e t e c t i o n s y s t e m) を使用した。ヘパラーゼ - 2 の相対発現量を定量するために、上流プライマ5' - C C G A T T C C T A T G C T G C A G G A - 3' および下流プライマ5' - T C A C G A C A T C A A T G C C C T G A - 3'

および蛍光標識プローブ(6-カルボキシフルオレセイン、6-カルボキシテトラメチルローダミン); 5'CTTATGGTTGAACACTTTAGGAA TGCTGGCC-3'を使用した。反応はすべて96ウェルプレートで40PCRサイクルで行った(ABI PRISM 7700 SDSによる)。一般的に使用したPCRサイクル: 1×50 2分、1×95 10分、40×95 および15秒60 1分。

【0084】

相対的mRNA発現は、上流プライマ5'-ATTGCCGACAGGATGCAGAA-3'、下流プライマ5'-TTCCAGCAGATGTGGATCAGC-3'および蛍光標識プローブ(6-カルボキシフルオレセイン、6-カルボキシテトラメチルローダミン)5'-CAAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGCA-3'を使用して-アクチンに標準化した。

【0085】

RNAおよびcDNAは、Analytical Biological Services Inc.(大動脈、骨髄、結腸、脳梁、リンパ節、卵巣、脊髄、胃)、Clontech、Heidelberg、(脳、心臓、腎臓、骨格筋、精巣、子宮、前立腺、膵臓、肝臓)およびInvitrogen、Netherlands(腫瘍組織)から入手した。

【0086】

実施例2

ヘパラーゼ-2のクローニングおよび発現

cDNAをSMART race cDNA amplification kit(#K1811-1、Clontech)によって前立腺全RNA(Clontech、Heidelberg)から作製した。上流プライマ1 5'-GCGAGACCCAGTAGGAAGAGAGG-3'および下流プライマ1 5'CAGCAGGCCCACTGGTAGCCAT-3'を使用したポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって、ヘパラーゼ-2 DNAをcDNAから増幅した。

【0087】

一般的なPCRサイクル：5サイクル 94 5秒、72 3分、5サイクル 94 5秒、70 10秒、72 3分、20サイクル 94 5秒、68 10秒、72 3分。

【0088】

PCR産物をさらにSMART race cDNA amplification kit (#K1811-1、Clontech)によって、上流プライマ2 5' - ATGAGGGTGCTTTGTGCCTTCCC - 3' および下流プライマ3 5' - TCGGTAGCGGCAGGCCAAAGCA - 3' を使用して増幅した。一般的なPCRサイクル：25サイクル 94 5秒、68 10秒、72 3分。

【0089】

PCR断片をpcDNA3.1/V5-His TOPO TAベクター(#K4800-01、Invitrogen)にクローニングして、BigDye-Kit (Applied Biosystems、Weiterstadt; ABI Prism 310 Genetic Analyzer)を使用して配列決定し、接着細胞の一時的トランスフェクションの方法(QuiaGen)に従ってSuperFectトランスフェクション試薬(#301305、QuiaGen)によってヒト293細胞(ATCC、Rockville、Maryland)へのトランスフェクトに使用した。24時間後、細胞を溶解緩衝液(50mMトリス pH7.5、NP40 10%、デオキシコール酸塩0.15%、EDTA 1mM、アプロテニンおよびロイペプチン1µg/ml、PMSEF1mM)で15分間溶解し、20000×gで10分間遠心して、Novex MiniGel(#E10001、Invitrogen)に加えた。ニトロセルロース(X cell blot module #E19051、Invitrogen)に移した後、発現したHep-2-V5-His融合蛋白質を抗V5-HRP抗体(#R961-25、Invitrogen)を使用して検出した。LacZ-V5-His (Invitrogen)を含んだベクターおよびTRAFを含んだpcDNA3/Hisベクター(Acc.No.Q13077)を対照として使用した。

【0090】

実施例3

ヘパラーゼ - 2の産生

C末端にヒスチジンタグを有するヘパラーゼを発現する細胞を溶解緩衝液(20mMトリス pH7.5; NaCl 150mM、TX-100 1%、NP40 0.25%、デオキシコール酸塩0.15%、アプロテニン1 μ g/ml、ロイペプチン1 μ g/ml、PMSF 1mM)で溶解した。発現した蛋白質をカラムマトリックスに固定し、Co、Ni、またはCuなどの金属イオンで修飾したNTAまたは酢酸イミドなどのキレート剤を使用して精製した。発現した蛋白質を抗His6抗体を使用してウェスタンブロットティング法によって検出した(QuiaGen/Invitrogen)。

【0091】

実施例4

ヘパラーゼ - 2 活性

ヘパラーゼ活性は、フルオレセインイソチオシアネート(FITC) - ヘパラン硫酸(HS)で決定することができる。ヘパラン硫酸(Sigma)1ミリグラムおよびFITC(Molecular probes, Oregon)1mgを0.1M炭酸ナトリウム緩衝液、pH9.5、200 μ lに溶解して、4で一晩攪拌した。次いで、この溶液をさらにPD-10脱塩カラム(Pharmacia)に加えてFITC-HSを単離した。細胞溶解物(実施例2)を反応混合物(FITC-HSを含む酢酸ナトリウム50mM、pH4.2)に添加して、37で18時間インキュベートした。ヘパリン(Sigma)を添加することによって反応を停止した。この反応によって得られたFITC-HSの産物をゲルクロマトグラフィ(Amersham Pharmacia)によって分析した。

実施例5

ヘパラーゼ - 2 特異的抗体の産生

PAGE電気泳動(Laemmli, 1970)を使用して精製したヘパラーゼ - 2を使用して、標準的方法で抗体を産生するためにウサギを免疫する。

【0092】

Hep-2から翻訳されたアミノ酸配列をDNASTARソフトウェア(DNASTAR Inc)を使用して分析し、免疫原性の高い領域を決定した。合成ペプチドを合成して(アミノ酸配列156~169(VALDK QKGCK IAQH)、249~262(ASKKY NISWE LGNE)、505~518(HRSRK KIKLA GTLR))、標準的方法によって抗体を作製するために使用した。

【0093】

このオリゴペプチドは長さが15残基で、M-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシニミドエステル(MBS、Pierce)との反応によってスカシガイヘモシアニン(KLH、Sigma)に結合させる。ウサギを完全フロイドアジュバント内でオリゴペプチド-KLH複合体で免疫する。たとえばニトロセルロースにペプチドを結合させ、1%BSAでブロックし、ウサギ抗血清と反応させ、洗浄し、ヤギ抗ウサギ-HRP(Biorad)と反応させて、得られた抗血清の抗ペプチド活性を試験する。組換え蛋白質または合成ペプチドで作製した高い力価の免疫血清は、組換え蛋白質をモニターしたり定量したりするために、確立されたELISA技法およびウェスタンブロット技法に使用した。一般に、所与の特異性の抗体を集めて、硫酸アンモニウムで沈殿させ、PBSに対して透析した。選択した血清をPierce製のビオチンのNHS-エステル誘導体を使用してビオチン化した。ビオチン化は製造元に従って実施した。ポリクローナル抗体を作製し、特徴付けるために使用した抗原および免疫化学的技法は、モノクローナル抗体特異性の産生のために使用する方法に容易に適用することができる。当業者なら、ハイブリドーマに基づいた技法または抗体ライブラリに基づいた方法などの古典的な技法を自分の裁量で選択することができよう。

【0094】

実施例6

ヘパラーゼ-2を評価する免疫アッセイ

組換えヘパラーゼ-2によって作製した特異的血清は、96ウェルマイクロタイタープレート(Nunc)をコーティングするために「捕捉抗体」として使

用した。抗ヘパラーゼ - 2 血清 (20 μ g / ml) 100 ml を使用してプレートを一晩コーティングした。使用前に、プレートを3回PBSで洗浄し、非特異的な結合を回避するためにBSA溶液 (1%) で1時間インキュベートした。過剰なブロッキング溶液を除去し、ヘパラーゼ - 2 100 μ l を系列希釈して添加し、1時間インキュベートした。検出用ビオチン化抗ヘパラーゼ - 2 抗体を適用する前にプレートを3回洗浄した。1時間後、ODB - タブレット (Dako) などの基質とのストレプトアビジン - POD 色反応を490 nm で決定して、読取りを実施した。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Merck Patent GmbH

5 <120> Novel heparanase

<130> HSPnaseKDWS

<140>

10 <141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

15 <210> 1

<211> 1779

<212> DNA

<213> Homo sapiens

20 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(1779)

25 <400> 1

atg agg gtg ctt tgt gcc ttc cct gaa gcc atg ccc tcc agc aac tcc	48
Met Arg Val Leu Cys Ala Phe Pro Glu Ala Met Pro Ser Ser Asn Ser	
1 5 10 15	

30 cgc ccc ccc gcg tgc cta gcc ccg ggg gct ctc tac ttg gct ctg ttg	96
Arg Pro Pro Ala Cys Leu Ala Pro Gly Ala Leu Tyr Leu Ala Leu Leu	
20 25 30	

35 ctc cat ctc tcc ctt tcc tcc cag gct gga gac agg aga ccc ttg cct	144
Leu His Leu Ser Leu Ser Ser Gln Ala Gly Asp Arg Arg Pro Leu Pro	
35 40 45	

40 gta gac aga gct gca ggt ttg aag gaa aag acc ctg att cta ctt gat	192
Val Asp Arg Ala Ala Gly Leu Lys Glu Lys Thr Leu Ile Leu Leu Asp	
50 55 60	

45 gtg agc acc aag aac cca gtc agg aca gtc aat gag aac ttc ctc tct	240
Val Ser Thr Lys Asn Pro Val Arg Thr Val Asn Glu Asn Phe Leu Ser	
65 70 75 80	

ctg cag ctg gat ccg tcc atc att cat gat ggc tgg ctc gat ttc cta	288
Leu Gln Leu Asp Pro Ser Ile Ile His Asp Gly Trp Leu Asp Phe Leu	
85 90 95	

50 agc tcc aag cgc ttg gtg acc ctg gcc cgg gga ctt tcg ccc gcc ttt	336
Ser Ser Lys Arg Leu Val Thr Leu Ala Arg Gly Leu Ser Pro Ala Phe	
100 105 110	

55 ctg cgc ttc ggg ggc aaa agg acc gac ttc ctg cag ttc cag aac ctg	384
Leu Arg Phe Gly Gly Lys Arg Thr Asp Phe Leu Gln Phe Gln Asn Leu	
115 120 125	

60 agg aac ccg gcg aaa agc cgc ggg ggc ccg gcc ccg gat tac tat ctc	432
Arg Asn Pro Ala Lys Ser Arg Gly Gly Pro Gly Pro Asp Tyr Tyr Leu	
130 135 140	

	aaa aac tat gag gat gac att gtt cga agt gat gtt gcc tta gat aaa	480
	Lys Asn Tyr Glu Asp Asp Ile Val Arg Ser Asp Val Ala Leu Asp Lys	
	145 150 155 160	
5	cag aaa ggc tgc aag att gcc cag cac cct gat gtt atg ctg gtg ctc	528
	Gln Lys Gly Cys Lys Ile Ala Gln His Pro Asp Val Met Leu Val Leu	
	165 170 175	
10	caa agg gag aag gca gct cag atg cat ctg gtt ctt cta aag gag caa	576
	Gln Arg Glu Lys Ala Ala Gln Met His Leu Val Leu Leu Lys Glu Gln	
	180 185 190	
15	ttc tcc aat act tac agt aat ctc ata tta aca gcc agg tct cta gac	624
	Phe Ser Asn Thr Tyr Ser Asn Leu Ile Leu Thr Ala Arg Ser Leu Asp	
	195 200 205	
20	aaa ctt tat aac ttt gct gat tgc tct gga ctc cac ctg ata ttt gct	672
	Lys Leu Tyr Asn Phe Ala Asp Cys Ser Gly Leu His Leu Ile Phe Ala	
	210 215 220	
	cta aat gca ctg cgt cgt aat ccc aat aac tcc tgg aac agt act agt	720
	Leu Asn Ala Leu Arg Arg Asn Pro Asn Asn Ser Trp Asn Ser Ser Ser	
	225 230 235 240	
25	gcc ctg agt ctg ttg aag tac agc gcc agc aaa aag tac aac att tct	768
	Ala Leu Ser Leu Leu Lys Tyr Ser Ala Ser Lys Lys Tyr Asn Ile Ser	
	245 250 255	
30	tgg gaa ctg ggt aat gag cca aat aac tat cgg acc atg cat ggc cgg	816
	Trp Glu Leu Gly Asn Glu Pro Asn Asn Tyr Arg Thr Met His Gly Arg	
	260 265 270	
35	gca gta aat ggc agc cag ttg gga aag gat tac atc cag ctg aag agc	864
	Ala Val Asn Gly Ser Gln Leu Gly Lys Asp Tyr Ile Gln Leu Lys Ser	
	275 280 285	
40	ctg ttg cag ccc atc cgg att tat tcc aga gcc agc tta tat ggc cct	912
	Leu Leu Gln Pro Ile Arg Ile Tyr Ser Arg Ala Ser Leu Tyr Gly Pro	
	290 295 300	
45	aat att ggg cgg ccg agg aag aat gtc atc gcc ctc cta gat gga ttc	960
	Asn Ile Gly Arg Pro Arg Lys Asn Val Ile Ala Leu Leu Asp Gly Phe	
	305 310 315 320	
50	atg aag gtg gca gga agt aca gta gat gca gtt acc tgg caa cat tgc	1008
	Met Lys Val Ala Gly Ser Thr Val Asp Ala Val Thr Trp Gln His Cys	
	325 330 335	
55	tac att gat ggc cgg gtg gtc aag gtg atg gac ttc ctg aaa act cgc	1056
	Tyr Ile Asp Gly Arg Val Val Lys Val Met Asp Phe Leu Lys Thr Arg	
	340 345 350	
60	ctg tta gac aca ctc tct gac cag att agg aaa att cag aaa gtg gtt	1104
	Leu Leu Asp Thr Leu Ser Asp Gln Ile Arg Lys Ile Gln Lys Val Val	
	355 360 365	
65	aat aca tac act cca gga aag aag att tgg ctt gaa ggt gtg gtg acc	1152
	Asn Thr Tyr Thr Pro Gly Lys Lys Ile Trp Leu Glu Gly Val Val Thr	
	370 375 380	
70	acc tca gct gga ggc aca aac aat cta tcc gat tcc tat gct gca gga	1200

	Met	Arg	Val	Leu	Cys	Ala	Phe	Pro	Glu	Ala	Met	Pro	Ser	Ser	Asn	Ser
	1				5					10					15	
	Arg	Pro	Pro	Ala	Cys	Leu	Ala	Pro	Gly	Ala	Leu	Tyr	Leu	Ala	Leu	Leu
				20					25					30		
5	Leu	His	Leu	Ser	Leu	Ser	Ser	Gln	Ala	Gly	Asp	Arg	Arg	Pro	Leu	Pro
			35					40					45			
	Val	Asp	Arg	Ala	Ala	Gly	Leu	Lys	Glu	Lys	Thr	Leu	Ile	Leu	Leu	Asp
		50					55					60				
	Val	Ser	Thr	Lys	Asn	Pro	Val	Arg	Thr	Val	Asn	Glu	Asn	Phe	Leu	Ser
10		65				70					75					80
	Leu	Gln	Leu	Asp	Pro	Ser	Ile	Ile	His	Asp	Gly	Trp	Leu	Asp	Phe	Leu
					85					90					95	
	Ser	Ser	Lys	Arg	Leu	Val	Thr	Leu	Ala	Arg	Gly	Leu	Ser	Pro	Ala	Phe
				100					105					110		
15	Leu	Arg	Phe	Gly	Gly	Lys	Arg	Thr	Asp	Phe	Leu	Gln	Phe	Gln	Asn	Leu
				115				120					125			
	Arg	Asn	Pro	Ala	Lys	Ser	Arg	Gly	Gly	Pro	Gly	Pro	Asp	Tyr	Tyr	Leu
		130					135					140				
20	Lys	Asn	Tyr	Glu	Asp	Asp	Ile	Val	Arg	Ser	Asp	Val	Ala	Leu	Asp	Lys
		145				150					155					160
	Gln	Lys	Gly	Cys	Lys	Ile	Ala	Gln	His	Pro	Asp	Val	Met	Leu	Val	Leu
					165					170					175	
	Gln	Arg	Glu	Lys	Ala	Ala	Gln	Met	His	Leu	Val	Leu	Leu	Lys	Glu	Gln
				180					185					190		
25	Phe	Ser	Asn	Thr	Tyr	Ser	Asn	Leu	Ile	Leu	Thr	Ala	Arg	Ser	Leu	Asp
			195				200						205			
	Lys	Leu	Tyr	Asn	Phe	Ala	Asp	Cys	Ser	Gly	Leu	His	Leu	Ile	Phe	Ala
		210				215						220				
30	Leu	Asn	Ala	Leu	Arg	Arg	Asn	Pro	Asn	Asn	Ser	Trp	Asn	Ser	Ser	Ser
		225				230					235				240	
	Ala	Leu	Ser	Leu	Leu	Lys	Tyr	Ser	Ala	Ser	Lys	Lys	Tyr	Asn	Ile	Ser
					245					250					255	
	Trp	Glu	Leu	Gly	Asn	Glu	Pro	Asn	Asn	Tyr	Arg	Thr	Met	His	Gly	Arg
				260					265					270		
35	Ala	Val	Asn	Gly	Ser	Gln	Leu	Gly	Lys	Asp	Tyr	Ile	Gln	Leu	Lys	Ser
			275					280					285			
	Leu	Leu	Gln	Pro	Ile	Arg	Ile	Tyr	Ser	Arg	Ala	Ser	Leu	Tyr	Gly	Pro
		290					295					300				
40	Asn	Ile	Gly	Arg	Pro	Arg	Lys	Asn	Val	Ile	Ala	Leu	Leu	Asp	Gly	Phe
		305				310					315					320
	Met	Lys	Val	Ala	Gly	Ser	Thr	Val	Asp	Ala	Val	Thr	Trp	Gln	His	Cys
				325						330					335	
	Tyr	Ile	Asp	Gly	Arg	Val	Val	Lys	Val	Met	Asp	Phe	Leu	Lys	Thr	Arg
				340					345					350		
45	Leu	Leu	Asp	Thr	Leu	Ser	Asp	Gln	Ile	Arg	Lys	Ile	Gln	Lys	Val	Val
			355				360						365			
	Asn	Thr	Tyr	Thr	Pro	Gly	Lys	Lys	Ile	Trp	Leu	Glu	Gly	Val	Val	Thr
		370					375					380				
	Thr	Ser	Ala	Gly	Gly	Thr	Asn	Asn	Leu	Ser	Asp	Ser	Tyr	Ala	Ala	Gly
50						390					395					400
	Phe	Leu	Trp	Leu	Asn	Thr	Leu	Gly	Met	Leu	Ala	Asn	Gln	Gly	Ile	Asp
					405					410					415	
	Val	Val	Ile	Arg	His	Ser	Phe	Phe	Asp	His	Gly	Tyr	Asn	His	Leu	Val
				420					425					430		
55	Asp	Gln	Asn	Phe	Asn	Pro	Leu	Pro	Asp	Tyr	Trp	Leu	Ser	Leu	Leu	Tyr
				435				440					445			
	Lys	Arg	Leu	Ile	Gly	Pro	Lys	Val	Leu	Ala	Val	His	Val	Ala	Gly	Leu
				450			455					460				
	Gln	Arg	Lys	Pro	Arg	Pro	Gly	Arg	Val	Ile	Arg	Asp	Lys	Leu	Arg	Ile
60						470					475					480
	Tyr	Ala	His	Cys	Thr	Asn	His	His	Asn	His	Asn	Tyr	Val	Arg	Gly	Ser

```

                485                490                495
Ile Thr Leu Phe Ile Ile Asn Leu His Arg Ser Arg Lys Lys Ile Lys
                500                505                510
5  Leu Ala Gly Thr Leu Arg Asp Lys Leu Val His Gln Tyr Leu Leu Gln
                515                520                525
Pro Tyr Gly Gln Glu Gly Leu Lys Ser Lys Ser Val Gln Leu Asn Gly
                530                535                540
Gln Pro Leu Val Met Val Asp Asp Gly Thr Leu Pro Glu Leu Lys Pro
545                550                555                560
10 Arg Pro Leu Arg Ala Gly Arg Thr Leu Val Ile Pro Pro Val Thr Met
                565                570                575
Gly Phe Tyr Val Val Lys Asn Val Asn Ala Leu Ala Cys Arg Tyr Arg
                580                585                590

```

15

【図面の簡単な説明】

【図1】

定量的リアルタイム逆転写酵素 - ポリメラーゼ連鎖反応 (Taq - Man) を使用した (ヘパラナーゼ - 2) Hep - 2 の *in vivo* 発現に関する図である。

【図2】

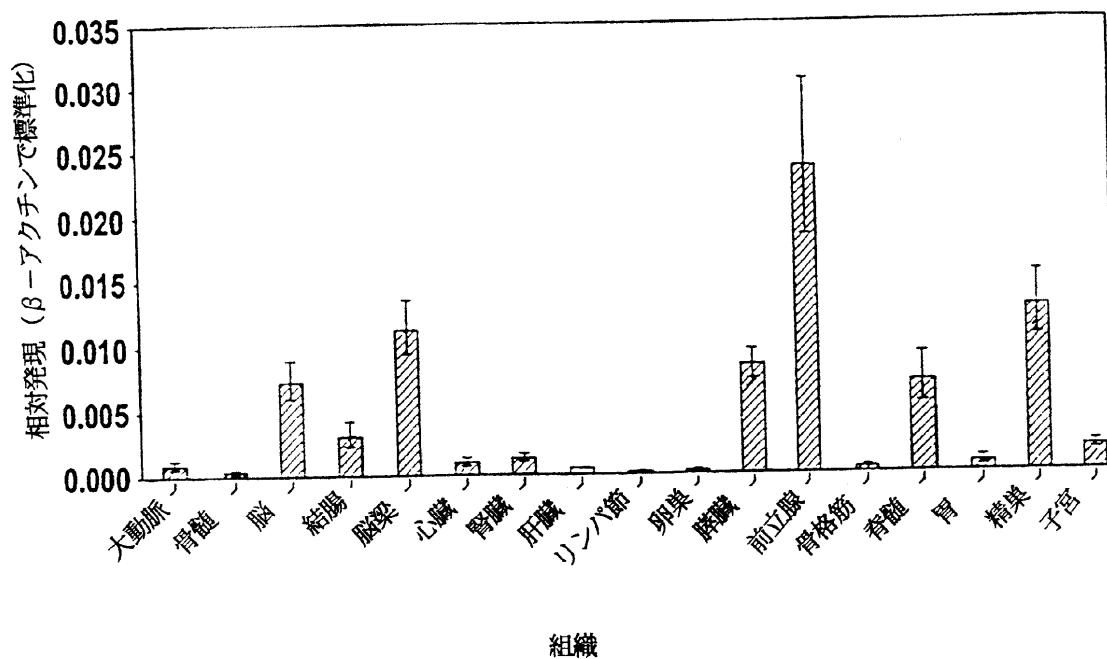
様々な腫瘍組織での Hep - 2 の発現に関する図である。

【図3】

293 ヒト腎繊維芽細胞におけるヘパラナーゼ - 2 (Hep - 2) の発現に関する抗 V 5 - HRP 抗体を使用したウェスタンブロット分析の結果を示す図である。レーン 1 (対照)、p c D N A 3 / T R A F - H i s で一時的にトランスフェクトした 293 細胞の細胞溶解物 ; レーン 2 (- g a l)、p c D N A 3 . 1 / l a c Z - V 5 - H i s で一時的にトランスフェクトした 293 細胞の細胞溶解物 ; レーン 3 (Hep - 2)、p c D N A 3 . 1 / H e p - 2 - V 5 - H i s で一時的にトランスフェクトした 293 細胞の細胞溶解物。

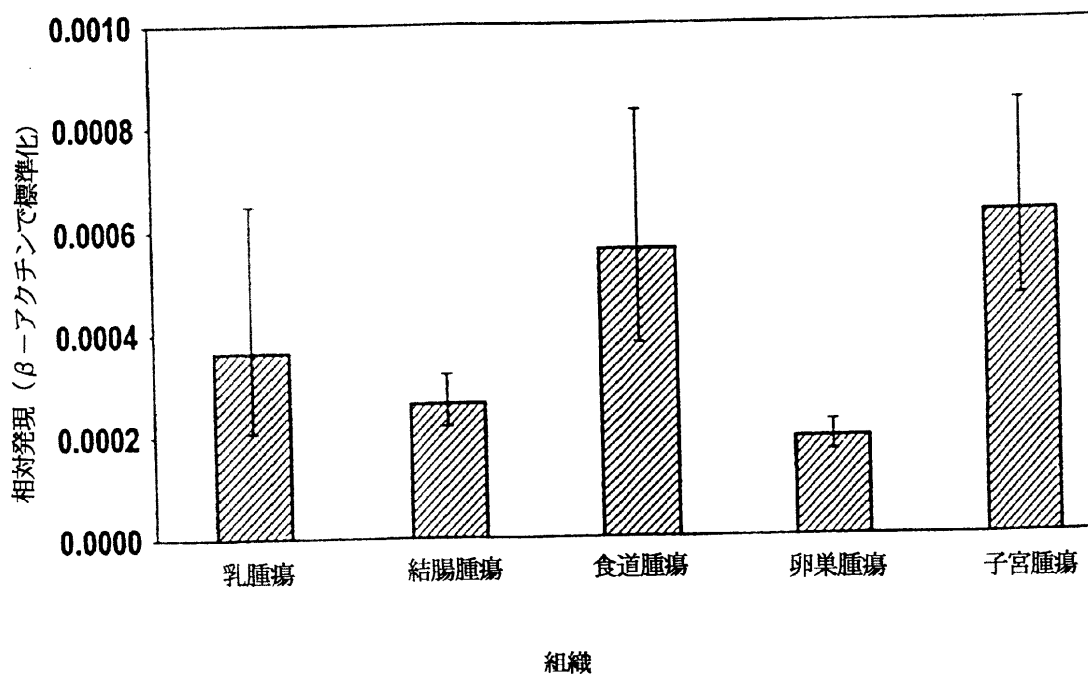
【図1】

Hep-2のin vivo発現

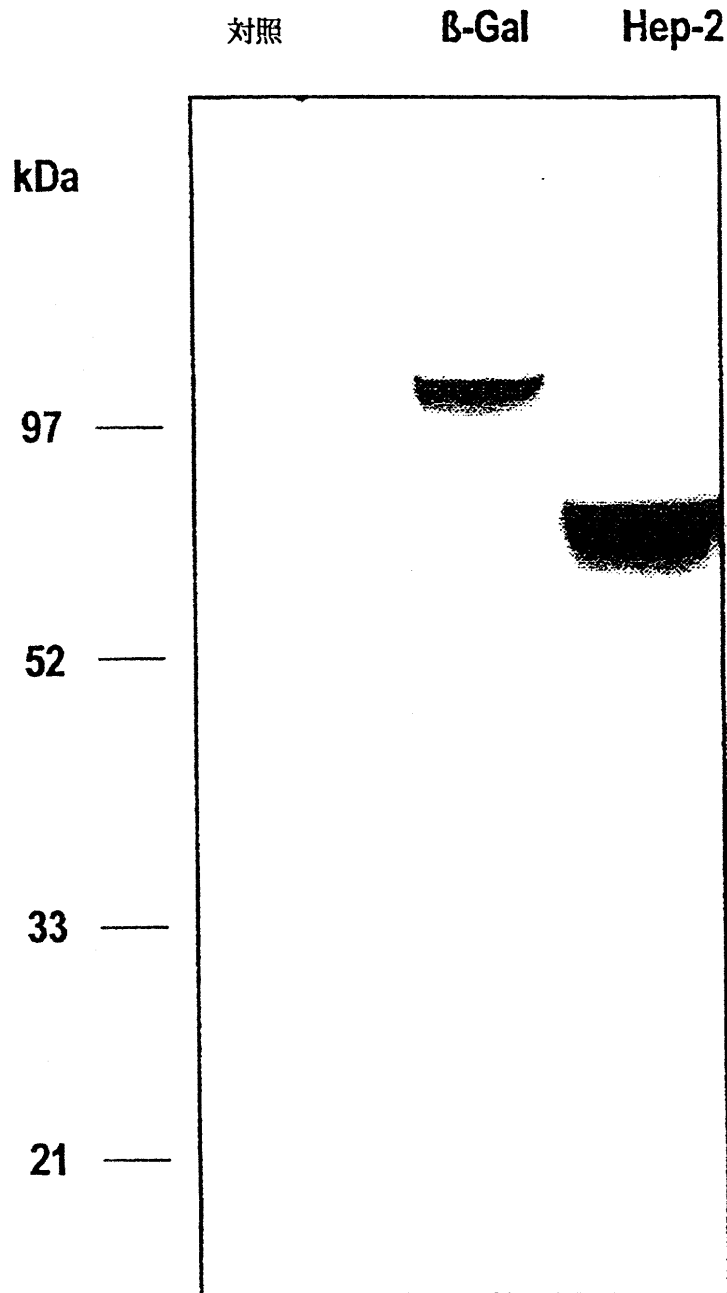


【図2】

腫瘍組織におけるHep-2の発現



【图3】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PCT/EP 00/08837
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	C12N15/56 A61K38/47	C12N15/62 A61K48/00
	C12N9/24 G01N33/50	C07K16/40 C12Q1/68
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 7 C12N C07K C12Q A61K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, STRAND, EMBL, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 43830 A (FAIRBANKS MICHAEL B ; HEINRIKSON ROBERT L (US); MILDNER ANA M (US);) 2 September 1999 (1999-09-02) the whole document	4
Y	page 9, line 13-18 ---	1-11
X	KOSIR M A ET AL.: "Degradation of basement membrane by prostate tumor heparanase" JOURNAL OF SURGICAL RESEARCH, vol. 81, no. 1, January 1999 (1999-01), pages 42-47, XPO02155606	1-3
Y	abstract page 45, right-hand column, line 13 -page 46, left-hand column, line 18 ---	4-11
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *B* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
19 December 2000		05/01/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer van de Kamp, M

5

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 00/08837

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KOSIR M A ET AL.: "Human prostate carcinoma cells produce extracellular heparanase" JOURNAL OF SURGICAL RESEARCH, vol. 67, no. 1, January 1997 (1997-01), pages 98-105, XP002155605	1-3
Y	abstract page 102, right-hand column, line 23 -page 103, left-hand column, line 15	4-10
X	DATABASE EMBL 'OnLine! EMBL; ID AI222323, AC AI222323, 30 November 1998 (1998-11-30) STRAUSBERG R: "gg97h02.x1 Soares_NFL_T_GBC_S1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1843155 3', mRNA sequence" XP002155607	4
Y	Note: 99 % nt seq ident with SEQ ID NO:1 in 121 nt overlap. the whole document	1-11
X	WO 99 11798 A (HADASIT MED RES SERVICE ;PECKER IRIS (IL); FEINSTEIN ELENA (IL); F) 11 March 1999 (1999-03-11)	4
Y	the whole document page 17, line 4-20	1-11
X	WO 99 21975 A (HAMDFORF BRENTON JAMES ;UNIV AUSTRALIAN (AU); FREEMAN CRAIG GEOFFRE) 6 May 1999 (1999-05-06)	4
Y	the whole document page 13, line 4-9	1-11
T	MCKENZIE E ET AL.: "Cloning and expression profiling of hpa2, a novel mammalian heparanase family member" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 276, no. 3, 5 October 2000 (2000-10-05), pages 1170-1177, XP002155087 Note: 99.8 % nt seq ident with SEQ ID NO:1 in 1779 nt overlap, 99.7 % aa seq ident with SEQ ID NO:2 in 592 aa overlap. the whole document page 1175, right-hand column, line 2-4	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PCT/EP 00/08837

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9943830 A	02-09-1999	AU 2759199 A	15-09-1999
WO 9911798 A	11-03-1999	US 5968822 A	19-10-1999
		AU 9125898 A	22-03-1999
		CN 1272886 T	08-11-2000
		EP 0998569 A	10-05-2000
		NO 996228 A	28-02-2000
		US 6153187 A	28-11-2000
WO 9921975 A	06-05-1999	AU 1010999 A	17-05-1999
		BR 9813296 A	22-08-2000
		EP 1032656 A	06-09-2000
		ZA 9809824 A	24-06-1999

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)	
C 1 2 N	5/10	C 1 2 Q	1/02	4 H 0 4 5
	9/88		1/25	
C 1 2 Q	1/02		1/68	A
	1/25	G 0 1 N	33/15	Z
	1/68		33/50	Z
G 0 1 N	33/15		33/53	Z
	33/50	C 1 2 N	15/00	Z N A A
	33/53		5/00	A
(81)指定国	E P (A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E) , C A , J P , U S			
(71)出願人	Frankfurter Str. 250 , D - 64293 Darmstadt , Fed eral Republic of Ge rmany			
(72)発明者	デュエッケル、 クラウス ドイツ連邦共和国 64291 ダルムシュタ ット エッテステルシュトラーセ 5			
(72)発明者	ジレンベルク、 クリスティアン ドイツ連邦共和国 64297 ダルムシュタ ット ハイน์リッヒ - デルプ - シュトラー セ 221			
F タ-ム(参考)	2G045 AA34 AA35 BB14 BB50 BB51 CB01 DA13 DA36 FA29 FB02 FB03 GC10 4B024 AA11 BA07 BA42 CA04 CA07 DA03 EA04 GA11 GA18 HA03 HA11 4B050 CC01 CC03 CC05 DD11 LL03 4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ13 QQ21 QQ53 QR38 QR57 QS17 QS34 QX02 QX10 4B065 AA93X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA27 CA46 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA86 DA89 EA50 FA74			

